

Aus dem Institut für Parasitologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Freien Universität Berlin  
Direktor: Prof. Dr. J. Boch

Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Haemagglutination,  
Flocculation, Mikro-Agar-Präzipitation und der Immunofluoreszenz  
zum frühzeitigen Nachweis der Fasciolose des Rindes

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Hans-Werner Koch  
Tierarzt aus Halle/Saale  
Berlin 1969  
Journal Nr. 671



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41550821\\_0097](https://archive.org/details/IA41550821_0097)

Aus dem Institut für Parasitologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Freien Universität Berlin  
Direktor: Prof. Dr. J. Boch

---

Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Haemaggluti-  
nation, Flocculation, Mikro-Agar-Präzipitation und der  
Immunofluoreszenz zum frühzeitigen Nachweis  
der Fasciolose des Rindes

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Hans-Werner Koch  
Tierarzt aus Halle/Saale  
Berlin 1969  
Journal Nr. 671



Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen  
Fakultät der Freien Universität Berlin.

Dekan: Prof. Dr. K. Bronsch

Referent: Prof. Dr. J. Boch

Korreferent: Prof. Dr. H. Hartwig

Tag der Promotion: 9. 7. 1969



## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                                                                                                          | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| I      Einleitung                                                                                                                                                                        | 1     |
| II     Die Anwendung der Haemagglutination,<br>Flocculation, Mikro-Agar-Präzipitation<br>und des indirekten Fluoreszenztestes<br>bei der Fasciolosediagnostik( anhand<br>der Literatur ) | 2     |
| III    Eigene Untersuchungen                                                                                                                                                             | 9     |
| A. Material und Methodik                                                                                                                                                                 | 9     |
| B. Ergebnisse                                                                                                                                                                            | 14    |
| 1) Haemagglutination und Flocculation                                                                                                                                                    | 14    |
| 2) Mikro-Agar-Präzipitation                                                                                                                                                              | 15    |
| 3) Indirekter Fluoreszenztest                                                                                                                                                            | 16    |
| IV    Besprechung der Ergebnisse                                                                                                                                                         | 20    |
| V     Zusammenfassung und Summary                                                                                                                                                        | 24    |
| VI    Literaturverzeichnis                                                                                                                                                               | 25    |
| Lebenslauf                                                                                                                                                                               |       |



## I. Einleitung

Eine frühzeitige Bekämpfung der weit verbreiteten Fasciolose des Rindes mit den neuen, auch auf gewisse Wanderstadien wirksamen Chemotherapeutika scheitert daran, daß die Infektion frühestens nach 67 Tagen durch die Kotuntersuchung nachzuweisen ist. Dabei treten klinische Symptome vielfach schon vor Ablauf der Präpatenz auf.

An künstlich mit *Fasciola hepatica* infizierten Jung-  
rindern überprüfte ich die Brauchbarkeit verschie-  
dener serologischer Nachweismethoden. Es kamen die  
Haemagglutination, die Flocculation, die Mikro-Agar-  
Präzipitation sowie der indirekte Fluoreszenztest  
zur Anwendung.

II. Die Anwendung der Haemagglutination, Flocculation, Präzipitation und des indirekten Fluoreszenztestes bei der Fasciolose  
( an Hand der Literatur )

Im Jahre 1951 erarbeitete BOYDEN eine Methode, die mit tannierten Schaeferythrocyten eine vermehrte Bindung von Antigen für die Haemagglutination ermöglichte. Er hatte Tuberkulin an Erythrocyten adsorbieren lassen und damit eine Haemagglutination in höheren Verdünnungen realisieren können.

STAVITSKY ( 1954 ) benutzte dieses Verfahren erfolgreich beim Nachweis von Diphtherie- und Tetanustoxoid. Bei Verwendung tannierter Erythrocyten erreichte er eine wesentlich höhere Empfindlichkeit als bei der Agglutination mit Collodiumpartikeln. FISHER ( 1952 ) hatte zwar die Methode dadurch modifiziert, daß er direkt zu den tannierten Erythrocyten 20 Teile Diphtherietoxin zufügte, doch sah er keine zufriedenstellende Bindung. STAVITZKY ( 1954 ) wiederum versuchte, dies Versagen auf die ungenügende Reinigung des Antigens zurückzuführen. STAVITZKY ( 1955 ) stellte vergleichende Untersuchungen mit diesem Verfahren und der Verwendung von bis-diazotiertem Benzidin nach KABAT und MAYER ( 1961 ) an. Danach war die Tanninmethode wesentlich sensibler und in jedem Falle dem Benzidinverfahren vorzuziehen.

KAGAN ( 1965 ) verglich bei Rind und Ziege die Haemagglutination mit der Agglutination lebender Schistosoma mansoni-Zerkarien. Es stellte sich dabei heraus, daß die Haemagglutination viel sensitiver war. GOMES ( 1968 ) hält die Haemagglutinationsreaktion für sensibler als den Latex-Test. Es reagierten bei Verwendung von Vollantigen 80 % , von Stoffwechselantigen sogar 97 % der infizierten Versuchstiere positiv.

STELICKA ( 1961 ) benutzte für die Haemagglutination mit Seren natürlich befallener Rinder 4 homologe Antigene. Es handelte sich dabei um einen wäßrigen Extrakt von pulverisierten *Fasciola hepatica* ( 1 ) bei 100° C, ferner um einen seitzfiltrierten wäßrigen Extrakt ( 2 ), um eine Polysaccharidfraktion ( 3 ) des großen Leberegels sowie um ultraschallbehandeltes frisches Trematodenhomogenat. Aus der Beobachtung, daß die höchste Spezifität das Antigen 1 hatte, folgerte er, daß eine positive Haemagglutination auf eine frische Infektion hindeutet. Er hält deshalb diesen serologischen Test für die frühzeitige Fasciolosedidiagnose besonders geeignet. Kreuzreaktionen traten nicht auf.

BIGUET, ROSÈ und CAPRON ( 1965 ) verglichen die Methode mit bis-diazotiertem Benzidin mit der Komplementbindungsreaktion und dem Konglutinationstest an Seren von Menschen mit Distomatose. Dabei erwies sich die Haemagglutination als das empfindlichste Verfahren. Auch war nach BABANKAS ( 1967 ) die Haemagglutination ( 60 - 84 % ) dem Intradermaltest ( 50 - 78 % ) überlegen.

In neuerer Zeit gewinnt auch die Flocculation an Bedeutung für die Frühdiagnostik verschiedener Infektionskrankheiten bzw. Parasitosen.

BOZICEVICH und Mitarb. ( 1951, 1952 ) sowie THOMAS und Mitarb. ( 1953 ) hatten die Bentonit-Methode beschrieben zur Früherkennung der Trichinose sowie der rheumatischen Arthritis. Sie erhielten bereits am 6. Infektionstag positive Ergebnisse. Schon innerhalb von 27 Tagen ließen sich mit der Flocculation spezifische Antikörper in 33 von 34 infizierten Tieren nachweisen.

Die gleichzeitig angewandte KBR erbrachte bei denselben 33 Tieren bereits am 20. Tag Titer, die um 2-3 Verdünnungsstufen höher lagen als bei der Flocculation, wenn das Serum einige Tage nach der Entnahme inaktiviert wurde.

NORMAN und Mitarb. ( 1959 ) verwandten den Bentonit-Flocculationstest zur Feststellung der Hydatidose bei Mensch und Tier. Sie untersuchten insgesamt 4148 Seren, wobei die Flocculation sich als sensitiver und zuverlässiger erwies als die KBR. Allerdings sahen sie Titer unter 1:10 als unspezifisch an. Auch hier hatte die Art des Antigens eine entscheidende Bedeutung. So erbrachten die Antigene aus den Bandwurmköpfen bessere Resultate als diejenigen aus der Hydatidenblasenflüssigkeit.

SADUN und NORMAN ( 1955 ) wandten die Flocculation ebenfalls für die Diagnose der Trichinose beim Menschen, Schwein und Kaninchen an. Von den verschiedenen Antigenen konnte die säurelösliche Fraktion unbegrenzt aufbewahrt werden, war sensitiver und brachte Ergebnisse, die leichter abzulesen und zu interpretieren waren als beim Vollantigen.

ANDERSON ( 1960 ) benutzte den Cholesterol-Lezithin-Flocculationstest zur Diagnose der Schistosoma mansonii-Infektion des Menschen.

Er hält diese Methode wegen ihrer Einfachheit und großen Empfindlichkeit für ein ideales Schnellverfahren. Allerdings reagierte das benutzte Zerkarien-Antigen auch mit Seren von Patienten mit Schistosoma japonicum- und Schistosoma haematobium-Infektionen.

SUSUMI und Mitarb. (1958) versuchten, bei Ziegen den Flocculationstest bei der Diagnose der Fasciolose an Stelle der Präzipitation als Labormethode einzuführen. Die wirksamste Antigenemulsion stellte eine Lipidfraktion aus lyophilisierten adulten Trematoden mit Cholesterinkristallen dar. Die 23 mit dem großen Leberegel infizierten Ziegen erbrachten serologisch Endtiter von 1:32 bis 1:8192, andererseits reagierten die 20 parasitenfreien Kontrollen ebenfalls, wenn auch nur mit Titern von 1:1 bis 1:16. Es wurden deshalb nur die Tiere als positiv bewertet, die Titer von 1:32 und darüber serologisch erbrachten.

CARPENTER und REISBERG (1968) modifizierten die Flocculationsmethode durch Verwendung von Carbodiimid, das eine bessere Bindung des Antigens an die Bentonitpartikel ermöglichte. In meinen Versuchen erfolgte die Präparation des Carbodiimids in Anlehnung an dieses Verfahren.

1956 führten ICHIHARA und Mitarb. die Mikro-Agar-Präzipitation bei Ziegen durch, die teilweise mit Leberegeln infiziert waren. Sie verwendeten Vollantigen aus adulten Trematoden. Ein Gemisch der Polysaccharid- und Lipidfraktion erbrachte bessere und spezifischere Reaktionen als andere Antigene. Sie folgern aus ihren guten Ergebnissen an Ziegen, daß diese serologische Methode auch bei leberegelbefallenen Rindern sichere Reaktionen bringe.

SPUHLER und Mitarb. (1958) versuchten den Nachweis von Antikörpern bei leberegelbefallenen Schlachtrindern mit der Präzipitationsmethode nach OUCHTERLONY (1965). Bei Verwendung verschiedener Leberegelextrakte als Antigene verlief der Test bei starken Infektionen bis zu 88% positiv. Dagegen wurde ein geringer Befall, wie es bei der chronischen Fasciolose des Rindes die Regel ist, nicht erfaßt. Über die zeitliche Früherkennung machen die Autoren keine Angaben.

SEWELL (1964) untersuchte sowohl Seren von mit *Fasciola gigantica* infizierten Mäusen, Kaninchen und Rindern als auch von Kaninchen, die mit *Fasciola*-Extrakten immunisiert worden waren, mit der Agargelpräzipitation. Als Antigene verwendete er bei den 38 verschiedenen Seren zwei Eiweiß- und eine Nichteiweißfraktion eines *Fasciola*-Extraktes. Während die Rinder- und Mäuseren mit der Eiweißfraktion kaum reagierten, erbrachten die Kaninchenserum damit gute Ergebnisse. Die Reaktionen mit der Antigen-Fraktion ohne Eiweißcharakter waren unspezifisch. Es wurde angenommen, daß es sich um Haptene handelte, da sie nicht mit Seren solcher Kaninchen reagierten, die zuvor mit Antigenen aus abgetöteten Leber-egeln behandelt worden waren.

Den frühesten Zeitpunkt des Auftretens von serologisch nachweisbaren Antikörpern gegen *Fasciola hepatica* untersuchte DRAGNEVA (1968) an experimentell infizierten Kaninchen. Während die Präpatenz (Zeit bis zur Ei-ausscheidung) mindestens 62 Tage betrug, wurden bereits zwischen dem 10. und 34. Tag die Komplementbindungsreaktion, die Agargelpräzipitation und die Agglutination mit Cholesterol positiv. Mit allen 3 Methoden konnten Antikörper bis zum 480. Tag p.i. nachgewiesen werden. Die KBR erwies sich beim Kaninchen als empfindlichste Methode.

Die von COONS und Mitarb. (1942) in die medizinische Diagnostik eingeführte Immunofluoreszenz ist in der Zwischenzeit zu einer recht beliebten und erfolgreichen Standardmethode in der Serologie geworden, denn der topographische Nachweis von Antigenen und Antikörpern wurde dadurch in Zellen und Geweben möglich, wo andere Methoden versagen. Der indirekte Fluoreszenztest, der den Vorteil größerer Wirtschaftlichkeit besonders bei reichlichem Anfall

von Untersuchungsmaterial bietet, wurde von WELLER und COONS ( 1954) zum Nachweis von Varicellen und Herpes zoster erstmals beschrieben.

Der indirekte Fluoreszenztest wurde in die Diagnostik von Helminthosen erst von SADUN (1963) eingeführt. Er brachte Schistosomen, Trichinellen und Filarien in positive Seren und behandelte diese anschließend mit fluoreszeinmarkierten Antiglobulinen. Dabei zeigte sich in jedem Falle eine deutliche Fluoreszenz.

Andere Autoren, wie COOKSON (1963), COOKSON und Mitarb. (1964) sowie KAGAN und Mitarb. (1965) verwendeten den Test zur Diagnose der Schistosomose des Menschen. Er erwies sich empfindlicher als Haemagglutination und Cholesterol-Lezitin-Test. Vergleichend überprüften COOKSON und Mitarb. (1964) die Methode unter Verwendung sowohl von Mirazidien als auch Zerkarien und Adulten von *Schistosoma haematobium* und *S. mansoni*. Dabei lieferte die Fluoreszenz mit Zerkarien und Mirazidien bessere Resultate als mit den adulten Trematoden. Auch wenn diese neue Methode noch einige Fehlerquellen habe, hält von MAYERSBACH (1967) die Immunofluoreszenz für ein vielseitig anwendbares serologisches Verfahren, das weiterhin intensiv angewandt und erprobt werden sollte, auch wenn es noch einen erheblichen Zeit- und Materialaufwand erfordere.

Erstmals prüfte THORPE ( 1965) die direkte Fluoreszenz auf ihre Anwendbarkeit in der Fasciolosediagnostik. Er benutzte 2 sowie 4 und 10 Wochen alte Leberegel aus experimentell infizierten Ratten als Antigen. Gleichzeitig gewann er von künstlich angesteckten Ratten und Schafen Globuline, die mit Fluoresceinothiozyanat konjugiert wurden. Während bei den 2 und 4 Wochen alten Fascioliden sich intensivste Fluoreszenz an der Kutikula und der dicht darunter liegenden Zellschicht zeigte, war sie bei den adulten Stadien zwar auch an

der Kutikula vorhanden und spezifisch, jedoch weniger intensiv. Hier fluoreszierten hauptsächlich die Darmzellen und Exkretionsgänge. Auch in den Bohrgängen der Leber zeigte sich extra- und intrazellulär positives Material.

COUDERT und Mitarb. (1967) schließlich berichten über den Fluoreszenztest an histologischen Schnitten bei der Leberdistomatose des Menschen. Sie halten diese Methode für ein ausgezeichnetes Verfahren, um vor Ablauf der Präpatenz schon frühzeitig die Distomatose nachzuweisen. Zudem sei der Fluoreszenztest genauer als Komplementbindungsreaktion und Intradermaltest.

Entsprechende Untersuchungen an Fasciolose-Rindern fehlen bisher. Um so interessanter erschienen meine Untersuchungen, zumal es sich hier um parasitenfrei aufgezogene und erst später künstlich mit dem großen Leberegel infizierte Jungrinder handelte, deren Infektionsstatus zum Zeitpunkt der Blutentnahmen genau bekannt war. Die von COUDERT und Mitarb. (1967) beschriebene Technik (mit Gefrierschnitten aus adulten Fasciola) wurde von mir mit nur geringgradigen Änderungen benutzt.

### III. Eigene Untersuchungen

#### A. Material und Methodik

Die zu untersuchenden Serumproben entnahm ich 15 Jung-  
rindern, die HÖRCHNER(1969) für klinische und immunologische  
Untersuchungen parasitenfrei in den ersten 8 Lebenswochen  
mit Milchaustauscher aufgezogen hatte und die dann vor und  
während der 6-monatigen Versuchsdauer im Offenstall mit Heu  
und einem Treber-Kleie-Gemisch gefüttert wurden. HÖRCHNER (1969)  
hatte die Tiere mit einem ovinen Fasciola hepatica- Stamm  
gruppenweise mit 150, 250 und 500 Metazerkarien sowie 12  
Wochen später 4 bisher leberegelfreie Kontrollen und die  
Versuchstiere (Belastungsinfektion) erneut mit je 2000 Meta-  
zerkarien infiziert.

Jede Woche wurden die Tiere geblutet und das Serum für die  
späteren Untersuchungen zum Teil tiefgefroren, zum Teil  
lyophilisiert. Ich überprüfte an diesen Seren die Brauchbar-  
keit des ~~Haem~~agglutinationstestes, der Flocculation, der Mikro-  
Agar-Präzipitation sowie der indirekten Fluoreszenzmethode  
für eine frühzeitige Fasciolose-Diagnose.

Beim Haemagglutinationstest werden Erythrocyten sensibilisiert  
und ihre Außenhülle mit Antigen beladen. Sind Antikörper im  
Serum vorhanden, fallen die Erythrocyten als flockige, zusam-  
mengeballte Partikel aus.

Zur Herstellung des Antigens wurden gewaschene Leberegel  
lyophilisiert, sodann zermörsert und 5 Stunden lang im Kühl-  
schrank mit Äther extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt  
bei  $-2^{\circ}\text{C}$  und 15 000 U/Min. zentrifugiert, der Überstand ver-  
worfen, der Bodensatz getrocknet, mit COONS-Puffer bei pH 8,2  
zerrührt und dann über Nacht stehengelassen. Nach Zentrifu-  
gieren dieser Suspension bei  $-2^{\circ}\text{C}$  und 15 000 U/Min. enthielt  
der Überstand das Antigen. Einen Teil dieses Vollantigens  
habe ich mit 2n HCL (bis pH 4,2) versetzt, wieder zentrifugiert  
und so im Überstand das säurelösliche Antigen erhalten. Beide  
Fraktionen wurden dialysiert, anschließend ihr Eiweißgehalt  
bestimmt, und bis zur Verwendung wieder lyophilisiert.

Zur Durchführung des Testes wird eine 2,5 %ige, mit SÖRENSEN'-

Puffer pH 7,2 hergestellte Erythrocytensuspension mit dem gleichen Volumen Tanninlösung (Fa. Merck Nr. 773 1:20 000) versetzt. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37° C wird die Suspension 3mal mit Puffer pH 7,2 gewaschen und bei 1500 g und 4° C zentrifugiert. Zu einer 2,5 %igen Suspension mit SÖRENSEN-Puffer pH 6,4 kommt dann eine gleiche Menge Antigenlösung in gleichem Puffer mit einer Eiweißkonzentration von 0,01-0,1mg %. Das Gemisch bleibt bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen und wird 3mal je 5 Minuten bei 1500g und 4° C in Waschflüssigkeit zentrifugiert. Das Erythrocytensediment suspendierte ich 2,5 %ig in Puffer und verwendete es am selben Tag zum Test.

Um nun nicht jedesmal eine neue Suspension anfertigen zu müssen, können die Erythrocyten mit Formalin konserviert werden. Hierbei werden je ein Teil Formaldehyd in phys. NaCl und Erythrocyten in phys. NaCl zu einer Suspension vermischt, die 2 Tage bei 4° C gelagert, dann kräftig aufgeschüttelt, 5mal in phys. NaCl gewaschen und bei 1500g und 4° C zentrifugiert wird. Danach werden die Erythrocyten für 18 Stunden bei 4° C in 5 %iger NaHSO<sub>3</sub> (Fa. Merck Nr. 6356) suspendiert und anschließend gegen Leitungswasser dialysiert. Diese Suspension ist dann monatelang stabil und kann wie frische verwendet werden.

Beim Test selbst werden in Proberöhrchen bzw. auf Platten progrediente Verdünnungsreihen des zu untersuchenden Serums angesetzt. Zu jedem Röhrchen setzt man eine dem Serumvolumen entsprechende Erythrocytensuspension (in den Kontrollen nur tannierte Erythrocyten) zu. Nach gutem Durchmischen wird 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Dann bleiben die Röhrchen über Nacht im Kühlschrank und werden anschließend bei 1000g zentrifugiert.

Bilden die Erythrocyten einen runden Knopf am Röhrchenboden, ist die Reaktion negativ. Ein gezackter Knopf stellt eine positive Reaktion dar. Beim Plattentest werden die Seren und die sensibilisierten Erythrocyten mit einem Stab verrührt und die Agglutination nach 6-10 Minuten unter Schwenken abgelesen.

Ich verfuhr im wesentlichen nach der Methode von ALLAIN und KAGAN (1961). Die Tannierung der Erythrocyten erfolgte nach BOYDEN (1951), und das bis-diazotierte Benzidin wurde der

Arbeit von KABAT und MAYER (1961) entnommen.

Die Flocculation bedient sich des gleichen Prinzips wie die Haemagglutination, jedoch werden die Erythrocyten durch Latex oder Bentonit ersetzt. An der Oberfläche dieser Partikel lagert sich das Antigen vermehrt an. Nach der Reaktion mit vorhandenen Antikörpern ballen sich die Partikel dann zu größeren Flocken zusammen und werden so sichtbar. Das Antigen wurde in derselben Weise wie für die Haemagglutination hergestellt.

Antigene können an der Oberfläche der Latex- oder Bentonitpartikel adsorbiert werden und verleihen damit dieser Oberfläche die spezifische Eigenschaft des Proteinantigens. Dabei verhält sich die Menge des Proteins in der ersten Adsorptionsphase zur Oberfläche proportional. So kann ein Latexpartikel von 0,802  $\mu$  Durchmesser maximal 75 000 Moleküle  $\gamma$  Globulin adsorbieren. Antikörper gegen das Protein reagieren spezifisch mit den an der Oberfläche adsorbierten Antigenmolekülen. Dabei werden die Latex- oder Bentonitpartikel in die Reaktion einbezogen, ohne selbst am spezifischen Vorgang direkt beteiligt zu sein. Das weißliche Agglutinat wird durch Methylenblauzusatz noch deutlicher.

1 ml Antigenlösung wurde in 20 ml Röhrchen mit 10 ml Bentonitstandardlösung versetzt und stark geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml gesättigter KCl- Lösung und erneutem Schütteln blieb das Gemisch 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen. Darauf wurde 1 ml einer 1 %igen Rinderserumalbuminlösung zugefügt und durchgeschüttelt. Schließlich mußte nach 10 Minuten nochmals 1 ml einer 1 %igen Methylenblaulösung zugesetzt, mehrfach geschüttelt und sofort bei 1300 U/Min. 15 Minuten zentrifugiert werden. Der Bodensatz wurde mit 10 ml Aqua dest. versetzt, das Gemisch geschüttelt und anschließend 15 Minuten bei 1300 U/Min. zentrifugiert. Nach erneuter Waschung nahm ich den verbleibenden Niederschlag mit 5 ml Aqua dest. auf und schüttelte kurz. Die Lösung hielt sich bei +4° C 1 - 2 Tage.

Die Bentonit-Stammlösung stellte ich nach dem üblichen Verfahren ( 0,5 g Bentonit in 100 ml Aqua dest., Homogenisieren, mehrfaches Manipulieren und Zentrifugieren) her. Nach Zusatz von Mergiolat 1: 10 000 ist die Lösung mehrere Monate im

Kühlschrank haltbar.

Vom inaktivierten Serum (30 Min., 56° C) wurde eine geometrisch progrediente Verdünnungsreihe bereitet, bis 1 : 4 mit gepufferter NaCl-Lösung, ab 1 : 8 mit Kaninchennormalserum. Pro Verdünnung pipettierte ich auf jedes Plattenfeld 2 Tropfen davon und setzte einen Tropfen sensibilisierter, gefärbter Bentonitstammlösung dazu. Nach 45 Minuten langem Schütteln der Platte auf einem Agitator wurde schließlich die Flocculation unter dem Mikroskop abgelesen.

Ich wandte zunächst die Originalmethode, wie sie ANDERSON (1960 und 1962) beim Nachweis der Schistosomiasis erprobt hatte, an. Später überprüfte ich auch eine in der Literatur beschriebene Modifikation des Verfahrens, wonach CARPENTER und BARSALLES (1967) sowie CARPENTER und REISBERG (1968) mit Carbodiimid ein besseres Anlagern von Antigen an Bentonit erwirkten.

Bei der Mikro-Agar-Präzipitation verwendete ich die Methode nach OUCHTERLONY (1965). Dabei wandert das in Agar-Gel verbrachte Antigen - Antikörper - Gemisch infolge der unterschiedlichen Molekulargrößen verschieden schnell gegeneinander, und die homologen Antigen - Antikörperfraktionen bilden Präzipitationslinien, die zur Sichtbarmachung angefärbt werden.

Als Antigen diente neben dem Vollantigen (wie bei der Haemagglutination) die säurelösliche Fraktion aus Fasciola hepatica- Extrakten, wie sie auch SADUN (1959), BIGUET und Mitarbeiter (1962) sowie BENEX (1964) verwandten.

Die Objektträger überschichtete ich in der üblichen Weise mit Agar und bereitete sie entsprechend für die Aufnahme von Antigen und Seren vor. Nach 24-stündigem Inkubieren der beschickten Platten in der feuchten Kammer erfolgte die mehrmalige Wässerung in Veronal-Puffer (1 Teil Stammlösung zu 4 Teilen Aqua dest.) mit und später ohne NaCl sowie anschließend deren Trocknung, Anfärbung mit Amidoschwarz und 4 malige Nachbehandlung in der Spüllösung (Methanol : Essigsäure : Aqua dest. = 45 : 10 : 45).

Waren in den zu untersuchenden Seren Antikörper vorhanden, so blieben nach der Spülung und Trocknung blau gefärbte Präzipitationsbanden aus den Objektträgern zurück.

Als vierte Methode überprüfte ich den indirekten Fluoreszenztest auf seine Brauchbarkeit für die frühzeitige Fasciolosediagnose.

Zur Antigenherstellung brachte ich adulte Leberegel( aus Rinder- bzw. Schaflebern) in Mäuselebergewebe, fror diese ein und stellte davon Gefrierschnitte her, die in CARNOY'scher Lösung 5 Minuten fixiert, in absolutem Alkohol abgespült und dann bis zur Verwendung im Tiefkühlfach aufbewahrt wurden.

Nach Herstellung von Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:20 bis 1:1280) der entsprechenden Rinderseren mit COONS-Puffer überschichtete ich die Gefrierschnitte damit, ließ diese eine halbe Stunde in der feuchten Kammer inkubieren und wusch sie dann dreimal 5 Minuten in COONS-Puffer aus. Anschließend wurden die Schnitte mit Konjugat (SYCCO Sylvana Millburn/N.J. Rabbit-anti-bovine) in einer Verdünnung 1:3 mit COONS-Puffer überschichtet, eine halbe Stunde in die feuchte Kammer gebracht und das überschüssige Konjugat 3x5 Minuten in COONS-Puffer ausgewaschen. Nach Kontrastierung mit EVANS' Blau (Fa. Merck, Nr. 3169) und erneutem 3x10 minütigem Auswaschen in COONS-Puffer deckte ich die Schnitte mit einem phosphatgepufferten Glycerintropfen und einem Deckgläschen ab. Bei Vorhandensein von Antikörpern gegen Leberegel im Serum zeigten die Schnitte eine gelblich-grünliche Fluoreszenz. Diese war an der Kutikula des Egels besonders deutlich, während das umliegende Lebergewebe einheitlich rot gefärbt erschien.

## B. Ergebnisse

### 1. Haemagglutination und Flocculation

Bei der Haemagglutination wurden, da die übliche Methode keine befriedigenden Ergebnisse brachte, verschiedene Modifikationen erprobt. Es wurden sowohl die Pufferlösungen gewechselt als auch die Eiweißkonzentration des Antigens zwischen 0,05 mg% und 0,1 mg % variiert. Ferner kamen Fasciola-Vollantigen und vergleichend die säurelösliche Antigenfraktion zur Anwendung. Ebenso wurden die Erythrocytensuspensionen gewechselt, indem ich anfangs Schaf-, später Kaninchenerythrocyten benutzte, die sowohl mit Tannin behandelt als auch formalinisiert worden waren.

In vielen Fällen trat nach Zusatz von Antigen zur Erythrocytensuspension bereits eine spontane Agglutination ein, sogar teilweise selbst bei den negativen Kontrollen. Auch Hochimmunserum erbrachte keine spezifische Agglutination. Die Methode nach BIGUET und Mitarb. (1965), die STEFFEN (1968) erneut beschrieb, wandelte ich in Anlehnung an STAVITSKY (1955) ab und setzte der Erythrocytensuspension bis-diazotiertes Benzidin zu. Dadurch wurde seinerzeit das Anlagern des Antigens an die Erythrocyten verbessert. Auch diese Variation brachte keine für den Nachweis der Fasciolose beim Rind befriedigenden Ergebnisse.

Die Flocculation wurde, da das klassische Verfahren versagte, ebenfalls mehrmals modifiziert. Da zunächst nach der Originalmethode mit Bentonit ein positiver Nachweis nicht gelang, versuchte ich, durch Verwendung von Carbo-diimid ein verstärktes Anlagern von Antigen an das Bentonit zu erreichen. Schließlich wurden auch die Pufferlösungen und Antigenkonzentrationen variiert. Trotzdem waren unter dem Mikroskop stets zumindest einige zusammengeballte Partikel zu beobachten. Dadurch war die exakte Feststellung der tatsächlichen Flocculation unmöglich.

Beide Verfahren, sowohl die Haemagglutination als auch die Flocculation, erwiesen sich als unbrauchbar.

## 2. Mikro-Agar-Präzipitation

Mit dieser Methode wurden die Seren aller künstlich mit *Fasciola hepatica* infizierten Jungrinder untersucht. Es handelt sich dabei um

3 Tiere (Versuchsgruppe I), die mit je 500 Metazerkarien,

4 " (Versuchsgruppe II), die mit je 250 " ,

4 " (Versuchsgruppe III), die mit je 150 "

erstmalig und nach 12 Wochen mit je 2000 Metazerkarien infiziert worden waren, sowie um 4 Kontrolltiere (Versuchsgruppe IV), welche während der ablaufenden Erstinfektion der Versuchsgruppen I - III leberegelfrei gehalten und erst mit der Belastungsinfektion dieser Jungrinder auch mit je 2000 Infektionsstadien angesteckt worden waren. Die Seren der Versuchsgruppen I - III wurden also über 20 Wochen, diejenigen der Kontrolltiere über 8 Wochen untersucht, wobei die 1. Woche (vor der Infektion) bzw. die 12. Woche jeweils den Leerwert darstellten.

Zunächst wurde für alle Seren das Antigen (aus adulten *Fasciola hepatica*) in einer Eiweißkonzentration von 2 mg% verwendet. Später setzte ich darüber hinaus Seren von 12 Wochen, die allerdings nicht aufeinanderfolgend, sondern mit einigen in Sprüngen ausgesucht worden waren, mit 0,5 mg%, 1 mg% sowie mit 3 mg% Eiweiß an. Eigenartigerweise reagierten die Seren von 5 Tieren (Nr. 5 und 7 der Versuchsgruppe II, Nr. 11 und 13 der Versuchsgruppe III und Nr. 14 der Kontrollgruppe) überhaupt nicht, obwohl sich die Rinder bei der Schlachtung als befallen erwiesen. Diese 5 negativen Tiere sind in der Tabelle 1, welche eine Übersicht über die Reaktionen mit Antigenen verschiedener Eiweißkonzentrationen gibt, nicht berücksichtigt.

Es ist auffallend, daß von den 7 überhaupt serologisch positiven Versuchstieren (Gruppe I - III) nur 3 ab der 2. Woche, ein weiteres ab der 9., Nr. 1 und 2 ab der 10. Woche und Nr. 12 sogar erst 2 Wochen nach der Belastung Antikörper im Serum enthielten. Von den 4 zur Zeit der Belastung der Gruppen I - III ebenfalls mit je 2000 Metazerkarien infizierten Kontrolltieren blieb Nr. 14 überhaupt negativ, die 3 positiven zeigten mit dem unterschiedlich konzentrierten Antigen ebenfalls nicht gleichmäßige Präzipitationsbanden. Die Anwendung der Mikro-Agar- Präzi-

| Gruppe          | I (=500+2000 H.C.) |   |   | II (=250+2000 H.C.) |     |   | III (=150+2000 H.C.) |   |     | IV (=2000 H.C.) |    |    |     |    |    |
|-----------------|--------------------|---|---|---------------------|-----|---|----------------------|---|-----|-----------------|----|----|-----|----|----|
| Ind. Nr.        | 1                  | 2 | 3 | 4                   | 5   | 6 | 7                    | 8 | 9   | 10              | 11 | 12 | 13  | 14 | 15 |
| mg Etw. 18      | 0,5                | 1 | 2 | 3                   | 0,5 | 1 | 2                    | 3 | 0,5 | 1               | 2  | 3  | 0,5 | 1  | 2  |
| Infektionswoche | 1                  | - | - | -                   | -   | - | -                    | - | -   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 2                  | - | - | -                   | -   | - | -                    | - | -   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 3                  | - | + | -                   | -   | - | -                    | - | +   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 4                  | - | - | +                   | -   | - | -                    | - | -   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 5                  | - | - | -                   | -   | - | -                    | - | -   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 6                  | - | - | -                   | -   | - | -                    | - | -   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 7                  | - | - | -                   | -   | - | -                    | - | -   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 8                  | - | - | -                   | -   | - | -                    | - | +   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 9                  | - | - | -                   | -   | - | -                    | - | -   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 10                 | - | + | -                   | -   | - | +                    | + | +   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 11                 | - | - | -                   | -   | - | +                    | + | +   | +               | +  | +  | +   | +  | +  |
|                 | 12                 | - | + | -                   | -   | - | +                    | + | +   | +               | +  | +  | +   | +  | +  |
|                 | 13                 | + | - | +                   | -   | - | +                    | + | +   | +               | +  | +  | +   | +  | +  |
|                 | 14                 | - | + | +                   | +   | + | +                    | + | +   | +               | +  | +  | +   | +  | +  |
|                 | 15                 | - | - | -                   | -   | - | -                    | - | -   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 16                 | + | + | +                   | +   | + | +                    | + | +   | +               | +  | +  | +   | +  | +  |
|                 | 17                 | - | + | -                   | -   | - | -                    | - | -   | -               | -  | -  | -   | -  | -  |
|                 | 18                 | - | + | +                   | +   | + | +                    | + | +   | +               | +  | +  | +   | +  | +  |
|                 | 19                 | - | + | +                   | +   | + | +                    | + | +   | +               | +  | +  | +   | +  | +  |

Tab. 1 : Übersicht über positive Reaktionen von Seren künstlich mit *Fasciola hepatica* infizierter Rinder in der Mikro-Agar-Präzipitation mit Antigenen aus adulten *Fasciola hepatica* in Eiweißkonzentrationen von 0,5, 1, 2 und 3 mg %.

pitation scheint deshalb auch bei der Verwendung von Adulten-Vollantigen mit 2 mg% oder 3 mg% Eiweißkonzentration keine brauchbare Nachweismethode zu sein, da von insgesamt 15 Tieren nur 10 und vereinzelt erst 9 Wochen nach der Infektion reagierten.

Von der Hypothese ausgehend, daß die einzelnen Entwicklungsstadien der Leberegel verschiedene Antigene entwickeln können, stellte ich Untersuchungen mit Präadulten-Antigen an. Es wurden hierzu 6 Kaninchen mit 50 Metazerkarien per os infiziert, nach 45 Tagen getötet, ihre Lebern in Scheiben zerlegt und die noch unreifen Leberegel herausgedrückt. Aus diesen Egelstadien gewann ich, wie in der Methodik beschrieben, ein Gesamtantigen und führte die Präzipitation mit allen Tiseringen durch.

Die Seren der 11 Versuchsrinder (Gruppe I - III) wurden über die ersten 12 Wochen (Erstinfektion) und diejenigen der 4 Kontrolltiere von der 12. bis 19. Woche untersucht (Tabelle 2), wobei ich das Antigen auf eine Eiweißkonzentration von 2 mg% einstellte. Die Seren von den Versuchstieren Nr. 12 und 13 (Gruppe III war mit nur 150 Metazerkarien infiziert worden) sowie des Kontrolltieres Nr. 14 zeigten gar keine Präzipitationsbanden. Dagegen reagierten von den restlichen 11 Tieren bereits in der 2. Woche nach der Infektion 9 und je eins in der 5. und 9. Woche positiv. Es waren also die Ergebnisse mit dem Präadulten-Antigen besser.

### 3. Indirekter Fluoreszenztest

Entsprechend der Versuchsanordnung wurden die Seren der 11 Jungrinder der Versuchsgruppen I bis III über 19 Wochen, diejenigen der 4 erst nach 12 Wochen mit je 2000 Metazerkarien infizierten Kontrolltiere nur über 4 Wochen untersucht. Es stellte sich bei der Verwendung von Adulten-Antigen eine große Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der Fluoreszenzmethode heraus, sodaß sie für eine frühzeitige Erkennung einer Fasciolose geeignet erscheint.

Schon 2 Wochen nach der Infektion konnten Antikörper, wenn

| Gruppe                   | I     | II      | III         | Kontr. IV |
|--------------------------|-------|---------|-------------|-----------|
| Rind Nr.                 | 1 2 3 | 5 6 7 8 | 10 11 12 13 | 4 5 14 15 |
| Infektionswoche          |       |         |             |           |
| Belastungs-<br>infektion |       |         |             |           |
| 1                        | +     | +       | +           | +         |
| 2                        | +     | +       |             |           |
| 3                        | +     | +       |             |           |
| 4                        | +     | +       |             |           |
| 5                        | +     | +       |             |           |
| 6                        | +     | +       |             |           |
| 7                        | +     | +       |             |           |
| 8                        | +     | +       |             |           |
| 9                        | +     | +       |             |           |
| 10                       | +     | +       |             |           |
| 11                       | +     | +       |             |           |
| 12                       | +     | +       |             |           |
| 13                       | +     | +       |             |           |
| 14                       | +     | +       |             |           |
| 15                       | +     | +       |             |           |
| 16                       | +     | +       |             |           |
| 17                       | +     | +       |             |           |
| 18                       | +     | +       |             |           |
| 19                       | +     | +       |             |           |

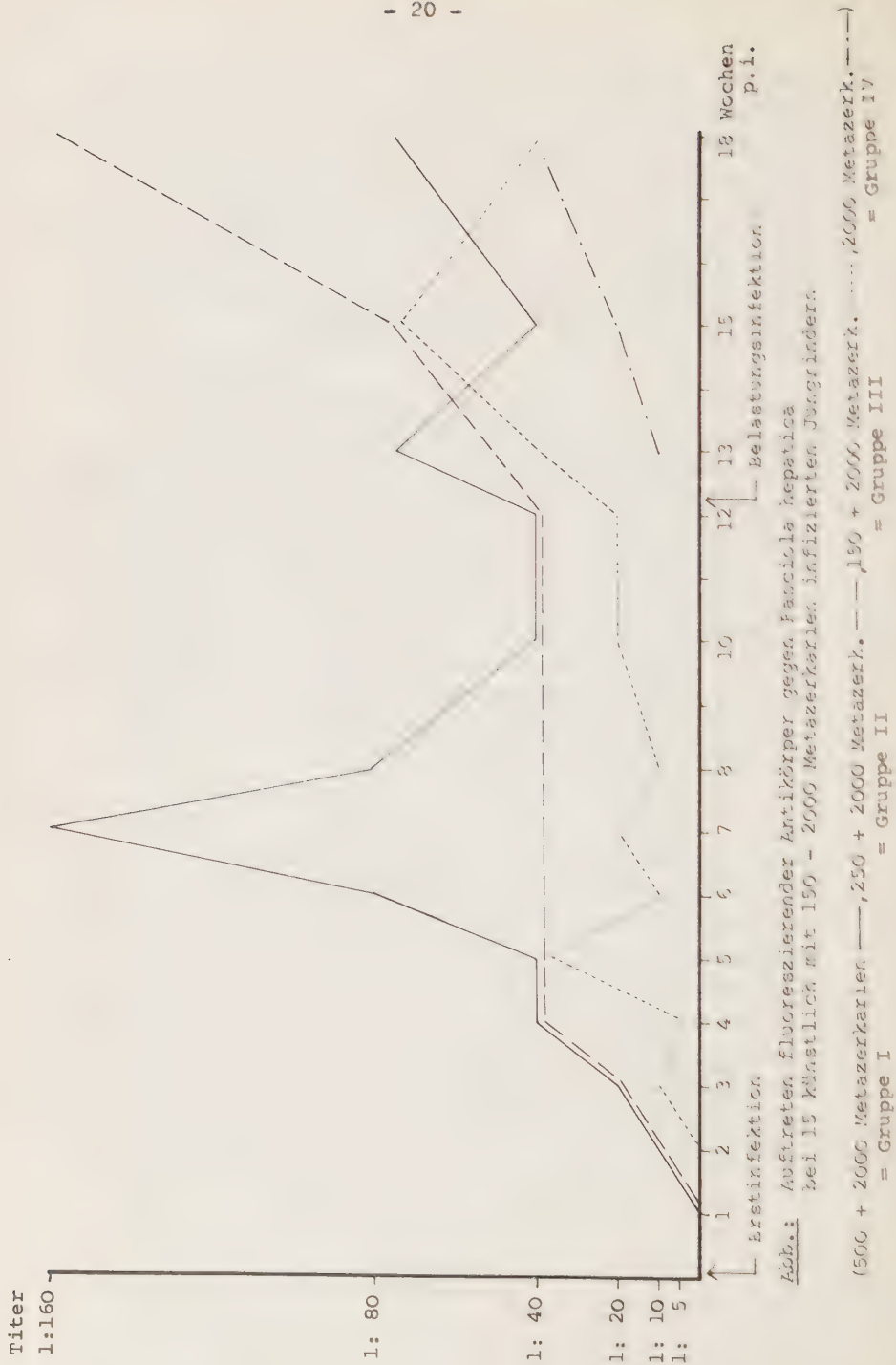
Tab. 2:

Mikro-Agar-Präzipitation von Seren künstlich mit Fasciola hepatica infizierter Jungreinder bei Verwendung von Präadulten-Antigen ( mit 2 mg% Eiweißkonzentration ).

auch nur Titer von 1:5 oder 1:10, in 10, nach 3 Wochen bereits in 13 der 15 Rinderseren nachgewiesen werden. Nach 4 Wochen waren alle Seren, mit einer Ausnahme, positiv und erreichten teilweise Titer von 1:40 bis 1:160 (Abb.). Dabei ist die jeweilige Titerhöhe sowohl von der Infektionsdosis als auch vom Einzeltier abhängig. Wie sich schon bei der Präzipitation zeigte, gibt es Tiere, die schneller und auch mehr Antikörper bilden können als andere bei gleicher Haltung und Infektion.

Faßt man die Ergebnisse der Versuchsgruppen I - III zusammen, so läßt sich sagen, daß bis zur 5. bzw. 7. Infektionswoche die Titer bis zu einem Maximum ansteigen und sich bis zur 12. Infektionswoche halten. Nach der am Ende der 12. Woche gesetzten Belastungsinfektion steigen die Titer nochmals bei der Gruppe II und III um 1 bzw. 2 Titerstufen über der der Erstinfektion an, während sie bei Gruppe I (mit der Höchstdosis) den Höchstwert von der Erstinfektion um eine Stufe verfehlen. Es kann eine gewisse Potenzierung angenommen werden, da der Titer der nur einmal infizierten Kontrollen in ähnlicher Weise, jedoch nicht zur selben Höhe ansteigt.

In der Hoffnung, mit Präadulten-Antigen auch in diesem Test ein noch besseres Ergebnis zu erreichen, infizierte ich weiße Mäuse mit 15 - 20 Metazerkarien per os, tötete sie nach 28 Tagen und fertigte Gefrierschnitte von den befallenen Lebern an. Es wurden allerdings Seren von nur 4 Tieren verglichen, da diese Modifikation infolge des schlechten Haftens der *Fasciola hepatica*- Infektion bei der Maus äußerst umständlich und zeitraubend ist. Im Gegensatz zur Präzipitation ließen sich Unterschiede weder in einem früheren Auftreten noch in der Höhe der Titer feststellen.



#### IV. Besprechung der Ergebnisse

Im Gegensatz zu STAVITSKY (1954), der bei der Tanninmethode ganz brauchbare Ergebnisse mit der Haemagglutination erhalten konnte, versagte dieser Test trotz verschiedener Modifikationen bei meinen Untersuchungen. Ich glaube, daß in Übereinstimmung mit FISHER (1952) die Bindung des Antigens an die Erythrocyten nicht stattfand. Ferner waren Unterschiede in den Ergebnissen der Tannin- und Benzidin-Methode, wie sie STAVITSKY (1955) beschrieb, nicht festzustellen. Auch die Meinung von SIELICKA (1961), daß die Haemagglutination für den Nachweis einer frischen Leberegelinfektion geeignet sei, haben meine Untersuchungen nicht bestätigen können. Allerdings wurden keine Versuche mit Polysaccharidfraktionen von *Fasciola hepatica* angestellt.

Bei der Flocculationsmethode war es ähnlich. Die Beobachtungen von BOZICEVICH und Mitarb. (1951, 1957), NORMAN und Mitarb. (1959) sowie von ANDERSON (1960) beim Nachweis der Trichinellose und Hydatidose konnte ich für *Fasciola hepatica* nicht bestätigen. SUSUMI und Mitarb. (1958) führten den Test zwar mit Cholesterolpartikeln aus, aber das Prinzip ist ja das gleiche. Die Ergebnisse stimmen mit den hier angeführten Untersuchungen nicht überein. Es muß dabei allerdings gesagt werden, daß SUSUMI Lipid-Fraktionen von *Fasciola hepatica* verwendete.

Die Ergebnisse von CARPENTER und REISBERG (1968), die mit Hilfe von Carbodiimid eine bessere Bindung des Antigens an die Bentonitpartikel erzielten, konnten beim Rind nicht reproduziert werden. Nach STEFFEN (1968) werden Reagine sowie blockierende und haemagglutinierende Antikörper unterschieden. Während die beiden letzteren mit Erythrocyten, an die mit Tannin oder bis-diazotiertem Benzidin Antigen angelagert wird, Reaktionen ergeben, ist dies bei den Reaginen nicht der Fall. Ein eventuelles Überwiegen der Antikörper vom Reagintyp könnte eine gewisse Erklärung dafür sein, daß diese beiden serologischen Nachweismethoden bei unseren Rindern negativ verliefen.

Die Mikro-Agar-Präzipitation brachte den Nachweis, daß Rinder Antikörper bilden, wenn auch eine Frühdiagnose mit Adulten-Antigen, wie sie ICHIHARA und Mitarb. (1956) beschrieben, nicht möglich war. SPUHLER und Mitarb. (1958) geben die Genauigkeit des Nachweises mit 80% an, jedoch mit der Einschränkung, daß dies nur bei starkem Leberegelbefall möglich war. Diese Mitteilung wird durch meine Beobachtungen bestätigt, da nach der Belastungsinfektion mit 2000 Metazerkarien mehr Tiere positiv reagierten. Allerdings war zur selben Zeit bereits die Präpatenz abgelaufen, so daß zum Nachweis auch die einfache Kotuntersuchung genügte. SEWELL (1964) scheint dies ebenfalls zu bestätigen; Rinder- und Mäuseseren brachten mit einer Eiweißfraktion keine oder nur schlechte Ergebnisse, während Kaninchen besser und schneller Antikörper bildeten. Dies deckt sich mit der Angabe von DRAGNEVA (1968), die als Früherkennung bei Kaninchen den 10.-34. Tag angibt.

Bessere Ergebnisse brachte die Präzipitation mit dem Präadultenantigen. Von 11 Tieren reagierten bereits 9 nach der 2. Infektionswoche, die beiden anderen kamen in der 5. bzw. 9. Woche nach. Das Problem über die Wirksamkeit verschiedener Antigenfraktionen bedarf weiterer Untersuchungen.

Der indirekte Fluoreszenztest nach WELLER und COONS (1954) kann als die beste und genaueste Methode aller 4 untersuchten bezeichnet werden. Diese Erkenntnis stimmt mit den Folgerungen von SADUN (1963) überein. Auch die Ergebnisse von COOKSON und Mitarb. (1964) sowie KAGAN und Mitarb. (1965) konnten bestätigt werden. Sie hielten die Fluoreszenz der Haemagglutination und der Flocculation weit überlegen. Was COUDERT (1967) für den Nachweis der Distomatose des Menschen beschrieb, daß mit der Fluoreszenz eine schon frühzeitige Diagnose möglich sei, haben meine Untersuchungen für das Rind ergeben.

THORPE (1965) wies bereits darauf hin, daß die Fluoreszenz mit jungen und adulten Leberegeln unterschiedliche

Resultate in der Intensität bringt. Auch in unseren Schnitten wiesen die Jugendstadien eine intensivere Fluoreszenz an der Kutikula auf als die erwachsenen Leberegel. Bei ihnen fluoreszierten mehr die Darmlumina und die Exkretionsgänge. Auf die Genauigkeit der Methode oder den Zeitpunkt der Früherkennung hat dies aber kaum Einfluß. Eine gewisse Eigenfluoreszenz, welche erwachsene Trematoden auch in den negativen Seren manchmal aufwiesen, läßt sich dadurch ausschalten, daß die Schnitte nach der Fixation für 5 Minuten in einer Tween 80-Lösung gespült werden.

## V. Zusammenfassung und Summary

Es wurden Untersuchungen an 15 mit *Fasciola hepatica* infizierten Jungrindern mit Hilfe der Haemagglutination, der Flocculation, der Mikro-Agar-Präzipitation und des indirekten Fluoreszenztestes durchgeführt. Haemagglutination und Flocculation brachten keine befriedigenden Ergebnisse.

Die Mikroagarpräzipitation mit Antigen aus jugendlichen Egelstadien brachte gute Ergebnisse, die eine Frühdiagnose gestatten. Die Ergebnisse mit Antigen aus adulten Stadien waren unbefriedigend.

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen erscheint der indirekte Fluoreszenztest von den verwendeten 4 serologischen Methoden das sicherste und genaueste Verfahren zu sein.

15 cattle infected with *Fasciola hepatica* were examined for antibodies by means of the haemagglutination test, the flocculation test, the micro-agar-precipitation, and the indirect-fluorescent-antibody test.

Haemagglutination und flocculation tests gave no satisfactory results.

Good results were obtained with the micro-agar-precipitation using antigen prepared of preadult *Fasciola hepatica*. By using this test it is possible to diagnose liver fluke infestations during prepatent period. Antigen-preparations from adult liver flukes were unsatisfactory.

Based on the present results the indirect-fluorescent-antibody test seems to be the most effective and exactest serological method for detecting antibodies against *Fasciola hepatica*.

VI. Literaturverzeichnis

1. Anderson, R. I. (1960): Serologic diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections. I. Development of a cercarial antigen slide flocculation test. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 9, 299-303
2. Anderson, R. I. (1962): Relationship of antibody nitrogen to titer obtained in the cercarial antigen slide flocculation test for schistosomiasis. *Expl Parasit.* 12, 434-440
3. Allain, D. S., I. G. Kagan (1961): The use of formalinized red cells in the serology of hydatid disease. *J. Parasit.* 47, 61-63
4. Babankas, M. (1967): Diagnostique immunobiologique de la fasciolose des betes. XVIII. Welt-Tierärztekongreß, Paris 17. - 22. 7., *Ber. Mitt.* I, 131-34
5. Bénex, J. (1964): Le diagnostic sérologique pratique de la distomatose. 1. Une méthode d'agglutination sur lame à l'aide d'antigène absorbé sur des particules de latex. *Bull. Soc. Path. exot.* 57, 495-502
6. Biguet, J., A. Capron, Ph. Tran van Ky (1962): Les antigenes de *Fasciola hepatica*. Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigenes correspondant à sept autres helminthes. *Annls Parasit. hum. comp.* 37, 221-231
7. Biguet, J., G. Rosé, A. Capron (1965): Le diagnostic de la distomatose à *Fasciola hepatica* par la réaction d'hémagglutination. Comparaison avec les résultats de l'immunoélectrophorèse et de la réaction d'haémolyse. *Bull. Soc. Path. exot.* 58, 866-878
8. Boyden, S. V. (1951): The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent haemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.* 93, 107-120
9. Bozicevich, J., J. E. Tobie, E. H. Thomas, H. M. Hoyem, S. P. Ward (1951): A rapid flocculation test for the diagnosis of trichinosis. *Publ. Hlth Rep.* 66, 806-814
10. Bozicevich, J., J. J. Bunim, J. Freund, S. B. Ward (1958): Bentonite flocculations test for rheumatoid arthritis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 97, 180-83

11. Carpenter, R. R., P. B. Barsales (1967): Uptake by mononuclear phagocytes of proteincoated bentonite particles stabilized with a carbodiimide. *J. Immun.* 98, 844-853
12. Carpenter, R. R., M. A. Reisberg (1968): Carbodiimide-induced bentonite-antigen complexes: Readily prepared immunoadsorbents. *J. Immun.* 100, 873-879
13. Cookson, L. O. C. (1963): Some investigations with the fluorescent antibody technique. I. Schistosomiasis. II. Preliminary investigations. *Cent. Afr. J. Med.* 9, 429-434
14. Cookson, L. O. C., V. de V. Clarke, E. Pirie (1964): \_\_\_\_ III. The threshold fluorescent antibody test in schistosomiasis. *Cent. Afr. J. Med.* 10, 12-16
15. Coons, A. H., H. J. Creech, R. N. Yons, E. Berliner (1942): The demonstration pneumococcal antigen in tissues by use of fluorescent antibody. *J. Immun.* 45
16. Coudert, J., J. P. Garin, P. Ambroise-Thomas, Kien Truong Thai, J. Despeignes, M. A. Pothier (1967): La réaction d'immuno-fluorescence sur coupes de *Fasciola hepatica*: Une nouvelle technique pour le sérodiagnostic de la Distomatose. *Bull. Soc. Path. exot.* 60, 71-79
17. Dragneva, N. (1968): Serological investigations in experimental fasciolosis (in Bulgarisch). *Izv. tsent. khelmint. Lab., Sof.* 12, 87-96
18. Fisher, S. (1952): The estimation in vitro of small amounts of diphtheria antitoxin by means of a haemagglutination technique. *J. Hyg.* 50, 445-456
19. Gomes Garcia, V. (1968): Serologia de la distomatosis hepatica. *Revta ibér. Parasit.* 28, 423-454
20. Hörchner, F. (1969): Klinische und immunologische Untersuchungen an experimentell mit *Fasciola hepatica* infizierten Rindern. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 82, 204-208
21. Ichihara, T., S. Susumi, T. Kuramoto (1956): Studies on the diagnosis of fascioliasis. III. Praecipitation test for fascioliasis in goats. *Jap. J. vet. Sci.* 18, 137-140
22. Kabat, E. A., M. M. Mayer (1961): Azo proteins. In: *Experimental Immunochemistry*. C. Thomas, Springfield/Ill.

23. Kagan, I. G., A. J. Sulzer, K. Carner (1965): An evaluation of the fluorescent antibody test for the diagnosis of schistosomiasis. Am. J. Epidemiol. 81, 63-70
24. Mayersbach, H. von (1967): Immunfluoreszenz. Ärztl. Lab. 13, 317-331
25. Norman, L., E. H. Sadun, D. S. Allain (1959): A bentonite flocculation test for the diagnosis of hydatid disease in man and animals. Am. J. trop. Med. Hyg. 8, 46-50
26. Ouchterlony, Ö. (1965): Gel-diffusions techniques. Immunochemie, 13-35
27. Sadun, E. H., L. Norman (1955): The use of an acid soluble protein fraction in the flocculation test for the diagnosis of trichinosis. J. Parasit. 41, 476-482
28. Sadun, E. H., S. S. Lin, B. C. Walton (1959): Studies on the host parasite relationships to *Schistosoma japonicum*. III. The use of purified antigens in the diagnosis of infections in human and experimental animals. Milit. Med. 24, 428
29. Sadun, E. H. (1963): Seminar on immunity to parasitic helminths. VII. Fluorescent antibody technique for helminth infections. Expl Parasit. 13, 72-82
30. Sewell, K. M. H. (1964): The immunology of fascioliasis. II. Qualitative studies on the precipitin reaction. Immunology 7, 671-680
31. Sielicka, B. (1961): Hemagglutination test with the antigen *Fasciola hepatica* (in Polish). Wiad. parazyt. 7, 343-345
32. Spuhler, V., G. A. Moosbrugger, K. Meyer (1958): Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Serum der mit Leberegeln behafteten Rinder. Schweizer Arch. Tierheilk. 100, 610-615
33. Stavitsky, A. B. (1954): Micromethods for the study of proteins and antibodies. J. Immun. 72, 360-367
34. Stavitsky, A. B., E. R. Arquilla (1955): Micromethods for the study of proteins and antibodies. III. Procedure and applications of haemagglutination and haemagglutination-inhibition reactions with bis-diazotized benzidine and protein-conjugated red blood cells. J. Immun. 74, 306-312

35. Steffen, C. (1968): In: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
36. Susumi, S., T. Kuramoto, Tsuy. Ichihara, Tsur. Ichihara (1958): Studies on the rapid flocculation test for fascioliasis. I. Investigation on the antigens and technique for the rapid flocculation test. Jap. J. Parasit. 7, 666-673
37. Thomas, E. H., J. Bozicevich, H. M. Hoyem (1953): Flocculation reactions in rabbits experimentally infected with *Trichinella spiralis*. J. infect. Dis. 92, 89-96
38. Thorpe, E. (1965): An immunocytochemical study with *Fasciola hepatica*. Parasitology 55, 209-214
39. Weller, Th. H., A. H. Coons (1954): Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 86, 789-794.

Für die Überlassung des Themas und die stets  
unermüdliche Unterstützung danke ich  
Herrn Professor Dr. J. Boch recht herzlich.

Mein weiterer Dank gilt ebenso den Angehörigen  
des Instituts, insbesondere den Herren  
Priv. Doz. Dr. F. Hörchner und Dr. G. Weiland,  
deren fachliche Beratung und wertvolle Hinweise  
wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.



## Lebenslauf

Am 14. 2. 1936 wurde ich als Sohn des Drehers Werner Koch und seiner Ehefrau Emma, geb. Henze, in Halle/Saale geboren.

Nach dem Besuch der Grundschulen in Haale/Saale bzw. Sennewitz/Saalkreis und der Thomas-Münzer-Oberschule in Halle/Saale legte ich 1954 die Reifeprüfung ab. Im Herbst 1954 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Humboldt Universität Berlin, setzte dies an der Freien Universität 1957 fort und beendete es im Dezember 1964 mit dem tierärztlichen Staatsexamen. Nach der vorgeschriebenen Praktikantenzeit erhielt ich im Sommer 1965 die Approbation als Tierarzt. Bis Ende 1967 war ich als wiss. Assistent (m.d.w.b.) an der Klinik für Tiergeburtshilfe und Kleintierkrankheiten der FU tätig. Zur Zeit bin ich in der pharmazeutischen Industrie tätig.

